

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0066939 (43) 공개일자 2012년06월25일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>C12N 9/24</i> (2006.01) <i>C12P 19/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0128300 (22) 출원일자 2010년12월15일 심사청구일자 2010년12월15일	(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교) (72) 발명자 이진원 서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수 기자촌아파트 201-1601호 (방이동) 조인호 서울특별시 서초구 방배3동 101-1206호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 양부현

전체 청구항 수 : 총 11 항

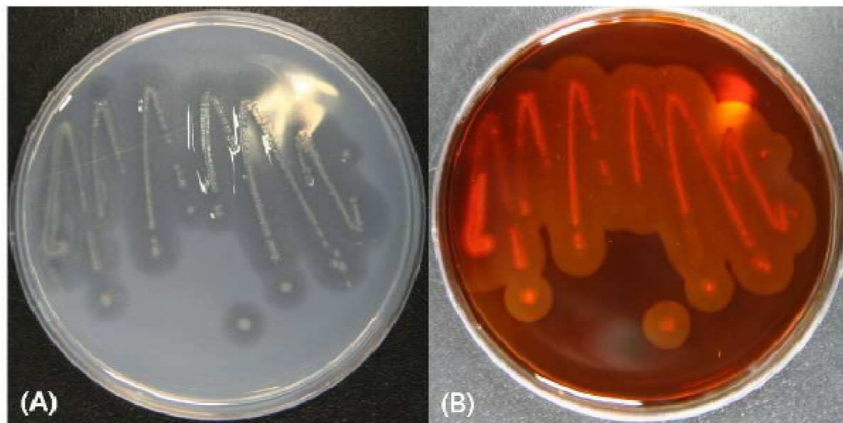
(54) 발명의 명칭 신규한 슈도알테로모나스 속 미생물 및 그가 분비하는 아가레이즈

(57) 요약

본 발명은 신규한 슈도알테로모나스 속 미생물 및 그가 분비하는 아가레이즈에 관한 것이다.

본 발명의 미생물이 생산하는 아가레이즈는 매우 우수한 염 안정성을 가질 뿐만 아니라, 전처리 없이도 우뚝가사리를 직접 분해할 수 있으므로 우뚝가사리를 기질로 직접 활용하는 당화 기술을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

오영훈

서울특별시 마포구 동교로41길 8, 4층 (연남동)

정창규

서울특별시 강동구 천중로39길 97-1 (천호동)

특허청구의 범위

청구항 1

아가레이즈(agarase)를 생산하는 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1(*Pseudoalteromonas sp. JYBCL 1*) KCCM11139P.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 아가레이즈는 우뭇가사리를 그 기질로 하는 것을 특징으로 하는 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 아가레이즈는 염화나트륨 농도 2000 mM에서의 효소활성이 염화나트륨 농도 0 mM에서의 효소활성의 70% 내지 100%인 것을 특징으로 하는 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 아가레이즈는 염화나트륨 농도 4000 mM에서의 효소활성이 염화나트륨 농도 0 mM에서의 효소활성의 50% 내지 80%인 것을 특징으로 하는 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1의 16s rRNA의 염기서열은 서열목록 제1서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1.

청구항 6

염화나트륨 농도 2000 mM에서의 효소활성이 염화나트륨 농도 0 mM에서의 효소활성의 70% 내지 100%인 것을 특징으로 하는 아가레이즈.

청구항 7

염화나트륨 농도 4000 mM에서의 효소활성이 염화나트륨 농도 0 mM에서의 효소활성의 50% 내지 80%인 것을 특징으로 하는 아가레이즈.

청구항 8

제 6 항 또는 제 7 항에 있어서 상기 아가레이즈는 제 1 항의 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1이 분비하는 것을 특징으로 하는 아가레이즈.

청구항 9

제 6 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 아가레이즈는 우뭇가사리를 그 기질로 하는 것을 특징으로 하는 아가레이즈.

청구항 10

다음의 단계를 포함하는 우뭇가사리를 당화하는 방법:

- (a) 우뭇가사리를 취득하는 단계; 및
- (b) 상기 취득한 우뭇가사리에 제 6 항의 아가레이즈를 처리하는 단계.

청구항 11

다음의 단계를 포함하는 우뭇가사리를 당화하는 방법:

- (a) 우뭇가사리를 취득하는 단계; 및
- (b) 상기 취득한 우뭇가사리를 제 1 항의 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1로 처리하는 단계.

명세서

기술 분야

- [0001] 본 발명은 신규한 슈도알테로모나스 속 미생물 및 그가 분비하는 아가레이즈에 관한 것이다.
- [0002] 보다 구체적으로 본 발명은 고염 환경에서 우뭇가사리를 직접 분해할 수 있는 아가레이즈를 생산하는 신규한 슈도알테로모나스 속 미생물 및 그가 분비하는 아가레이즈에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 바이오에너지란 생명체의 유기물인 바이오매스로부터 공정을 통해 얻어내는 재생 가능한 에너지를 일컫는다. 친환경적이고 경제성 있는 바이오에너지의 생산에 있어 관건이 되는 단계는 바이오에너지의 원료인 바이오매스의 확보와 당화기술 개발 단계이다. 친환경적이고 경제적인 바이오매스 및 그 전처리 기술 개발을 위해 여러 가지 관점에서 접근이 시도되고 있으며, 최근에는 제3세대 바이오매스라고 불리는 해조류를 바이오매스로 활용하기 위해 많은 연구개발이 이뤄지고 있다.
- [0004] 우뭇가사리란, 해양 홍조류의 일종으로서, 건조중량의 대부분이 탄수화물 성분으로 이뤄져 있기 때문에 최근, 특별히 국내에서 바이오에너지 생산을 위한 바이오매스 원료로서 주목받고 있다. 우뭇가사리의 약 60%는 갈락토오스 형태의 단당류가 결합되어 형성된 아가(agar)로 이뤄져 있기 때문에, 우뭇가사리를 바이오에너지 생산을 위한 바이오매스로 활용하기 위해서는 아가를 전 처리하여 단당류를 확보하는 기술개발이 필수적이다.
- [0005] 현재까지 해조류를 당화하는 기술은 기술개발의 초기 단계에 있다고 할 수 있으며, 1,2세대 바이오매스와 마찬가지로 크게 화학적 전처리 방법과 생물학적 전처리방법의 관점에서 연구개발이 이뤄지고 있다. 화학적 전처리 방법의 경우, 그 공법이 간단하고 생물학적 전처리 방법에 비해 비교적 많은 기술 개발이 이뤄져 왔다는 장점이 있으나, 전처리 산물 제거가 어려우며, 당화 공정에서 독성 부산물이 다량 발생하여 추가적인 윤리 환경적인 문제를 야기한다는 단점이 있다. 생물학적 전처리 방법의 경우, 주로 생명체가 생산하는 효소를 활용하는 관점에서 연구가 이뤄지고 있으며, 화학적 전처리 과정에서 발생하는 독성 부산물을 생성하지 않으며, 효소의 기질 특이적으로 반응한다는 것과 보다 각 효소의 최종산물이 명확하다는 점에서, 많은 잠재력을 갖고 있다.
- [0006] 아가를 분해하는 아가레이즈의 경우, 전통적으로는 바이오에너지 생산을 위한 바이오매스 확보의 측면에서 주목받기보다는 유전 공학에서 이용되는 아가로즈 겔 분해나, 올리고사카라이드를 생산하여 항산화제, 식품 첨가제, 화장품 첨가제 등을 생산하기 위한 관점에서 주목받아 왔다. 근래에는 바이오에너지 생산을 위한 바이오매스 전처리의 관점에서 주목받기 시작하였으나, 현재까지 그 기술은 아가로즈 혹은 아가의 분해에 국한되어있거나, 실제 상용화 가능한 공법개발의 측면에서는 개발정도가 미미한 실정이다. 아가로즈나 아가를 효소 반응의 기질로 이용하는 경우, 우선적으로 우뭇가사리로부터 아가로즈나 아가를 생산하는 전처리 과정이 선행되어야 하기 때문에, 우뭇가사리를 직접 그 기질로 활용하는 경우에 비해 경제성이 떨어진다고 할 수 있

다. 이에 본 발명에서는 우뭇가사리를 올리고사카라이드 생산을 위한 기질로 직접 활용하는 당화 기술을 개발하고자 노력하였다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 전처리 과정 없이 우뭇가사리를 기질로 직접 활용하는 당화 기술을 개발하고자 예의 연구 노력하였고 그 결과 고염 환경에서도 우뭇가사리를 직접 분해할 수 있는 아가레이즈를 생산하는 신규한 슈도알테로모나스 속 미생물을 동정해냄으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 아가레이즈를 생산하는 신규한 슈도알테로모나스 속 미생물을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 미생물이 생산하는 아가레이즈를 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 전처리 없이 우뭇가사리를 직접 당화하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 아가레이즈(agarase)를 생산하는 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1(*Pseudalteromonas sp. JYBCL 1*) KCCM11139P을 제공한다.

[0014] 본 발명자들은 전처리 과정 없이 우뭇가사리를 기질로 직접 활용하는 당화 기술을 개발하고자 예의 연구 노력하였고 그 결과 고염 환경에서도 우뭇가사리를 직접 분해할 수 있는 아가레이즈를 생산하는 신규한 슈도알테로모나스 속 미생물을 동정해냄으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0015] 본 발명의 아가레이즈 생성 미생물 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1은 우뭇가사리를 먹이로 삼는 소라의 내장에서 새롭게 분리해낸 것이다. 본 발명자들은 상기 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1을 기탁기관인 한국미생물보존센터에 2010년 11월 30일자로 기탁하고 기탁번호 KCCM11139P을 부여받았다.

[0016] 본 발명의 신규한 미생물의 16s rRNA의 염기서열은 서열목록 제1서열로 표시되며, 본 발명의 미생물은 그 계통상 슈도알테로모나스 속에 속한다.

[0017] 본 발명의 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1이 생산하는 아가레이즈는 우뭇가사리를 그 기질로 하기 때문에, 전처리 과정 없이 우뭇가사리를 직접 분해할 수 있는 것을 그 특징으로 한다. 기존에 알려진 아가레이즈의 경우, 아가로즈나 아가를 효소 반응의 기질로 이용하기 때문에 우뭇가사리로부터 아가로즈나 아가를 생산하는 전처리 과정이 필수적이지만, 본 발명의 미생물이 생산하는 아가레이즈는 우뭇가사리를 아가로즈 또는 아가로 변환시키는 전처리 없이 이를 직접 분해하므로 경제적이다.

[0018] 본 명세서에서 사용되는 용어 “우뭇가사리”는 우뭇가사리과에 속하는 홍조류의 해조류로 학명은 *Gelidium amansii*이며 바닷말의 일종으로 한천의 주원료로 이용되는 바닷말들을 가리킨다.

[0019] 용어 “아가(agar)”란 한천이란 홍조류의 세포벽 구성성분인 점질성의 난소화성 복합다당류를 의미한다. 아가는 아가로스(agarose)와 아가로펙틴(agaropectin)으로 구성되며, 주로 약 70%의 아가로스와 약 30%의 아가로펙틴으로 구성되어 있다.

- [0020] 본 발명의 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1는 기존에 알려진 다른 아가레이즈보다 현저하게 우수한 이온 안정성을 가지는 아가레이즈를 생산한다. 따라서, 상기 미생물이 생산한 아가레이즈는 고염 환경에서도 우수한 효소활성을 나타낸다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1이 생산하는 아가레이즈는 염화나트륨 농도 2000 mM에서의 효소활성이 염화나트륨 농도 0 mM에서의 효소활성의 70% 내지 100%이다.
- [0022] 다른 구현예에서, 상기 아가레이즈는 염화나트륨 농도 4000 mM에서의 효소활성이 염화나트륨 농도 0 mM에서의 효소활성의 50% 내지 80%이다.
- [0023] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 염화나트륨 농도 2000 mM에서의 효소활성이 염화나트륨 농도 0 mM에서의 효소활성의 70% 내지 100%인 것을 특징으로 하는 아가레이즈를 제공한다.
- [0024] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 염화나트륨 농도 4000 mM에서의 효소활성이 염화나트륨 농도 0 mM에서의 효소활성의 50% 내지 80%인 것을 특징으로 하는 아가레이즈를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 고염환경에서 우수한 안정성을 갖는 아가레이즈는 상술한 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1이 생산하는 효소이기 때문에, 상기 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1과의 관계에서 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0026] 일 구현예에서, 상기 아가레이즈는 우뭇가사리를 직접 그 기질로 한다. 우뭇가사리는 바다에서 유래한 것으로서 다량의 염을 함유하고 있지만, 본 발명의 아가레이즈가 고염환경에서도 높은 효소활성을 나타내므로 염을 완전히 제거하는 전처리 공정이 필요 없어 더욱 경제적이다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 우뭇가사리를 취득하는 단계; 및 (b) 상기 취득한 우뭇가사리에 제 6 항의 아가레이즈를 처리하는 단계를 포함하는 우뭇가사리를 당화하는 방법을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 우뭇가사리를 취득하는 단계; 및 (b) 상기 취득한 우뭇가사리를 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1로 처리하는 단계를 포함하는 우뭇가사리를 당화하는 방법을 제공한다.
- [0029] 아가로즈나 아가를 효소 반응의 기질로 이용하는 경우, 우선적으로 우뭇가사리로부터 아가로즈나 아가를 생산하는 전처리 과정이 선행되어야 하지만, 본 발명의 방법에 따르는 경우 우뭇가사리를 올리고사카라이드 생산을 위한 기질로 직접 활용하기 때문에 해조류를 고효율로 당화할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에서, 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1이 생산하는 아가레이즈로 우뭇가사리를 처리한 후 사용한 아가레이즈를 정제하여 재사용할 수 있으며 이 경우 더욱 효율적이고 경제적인 일련의 당화기술 체계를 확립할 수 있다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0032] (i) 본 발명은 신규한 슈도알테로모나스 속 미생물 및 그가 분비하는 아가레이즈를 제공한다.
- [0033] (ii) 본 발명의 미생물이 생산하는 아가레이즈는 매우 우수한 염 안정성을 가질 뿐만 아니라, 전처리 없이도 우뭇가사리를 직접 분해할 수 있으므로 우뭇가사리를 기질로 직접 활용하는 당화 기술을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 분리 미생물의 콜로니 군집 형태 및 루골 염색 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 분리 미생물의 생장에 염화나트륨이 미치는 영향을 보여주는 배양곡선이다(■; NaCl 5g/l에서의 생장곡선, ●; NaCl 15g/l에서의 생장곡선, ▲; NaCl 25g/l에서의 생장곡선).

도 3은 본 발명의 분리 미생물의 상동성 비교분석을 위하여 작성한 계통수를 나타낸다.

도 4는 분리 미생물의 아가 분해능을 확인하기 위한 균의 성장과 배지 내 점도를 측정한 결과이다(■; 대조군 점도, ●; 실험군 점도, ▲; 대조군 흡광도 ▼; 실험군 흡광도).

도 5는 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1이 분비하는 아가레이즈의 온도 최적화 실험결과를 나타낸다.

도 6은 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1이 분비하는 아가레이즈의 pH 최적화 실험결과를 나타낸다.

도 7은 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1이 분비하는 아가레이즈의 NaCl 농도가 증가함에 따른 상대적 활성도의 감소를 나타낸 그래프이다.

도 8은 기존에 알려진 아가레이즈의 NaCl 농도가 증가함에 따른 상대적 활성도의 감소를 나타낸 그래프이다.

도 9는 아가레이즈 추출물 SDS PAGE 전기영동을 시행하였고, 따로 제작한 아가 겔에 상기 전기영동 겔을 덮어 반응시킨 후 루골용액으로 염색하여 확인한 아가레이즈 밴드이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0036] 실시예

[0037] 본 발명에서는, 우뚝가사리를 먹이로 삼는 소라의 내장에서 아가레이즈를 분비하는 미생물을 찾고자 노력하였다. 아가 분해능을 갖는 미생물을 선별하기 위해, 두 가지의 선별 조건을 이용하였다. 첫째로 고체 아가 배지 상에 미생물이 형성하는 콜로니 주변에 침식 작용이 일어났는가를 확인하였고, 둘째로는 루골용액으로 고체배지를 염색하여 아가 분해가 일어났는가를 확인하였다.

[0038] 배양 배지 내에 아가가 분해되어 존재하는 환원당과 효소 활성도 측정에서 생성되는 환원당, 보다 정확하게는 증가된 환원당단기의 양을 정량적으로 측정하기 위해 DNS 방법을 이용하였다. DNS 시약은 2M NaOH 50 ml에 0.25 g의 3,5-디니트로살리실산과 75 g의 소듐 포타슘 타트레이트(sodium potassium tartrate)를 녹이고 부피가 250 ml이 되도록 물로 희석하여 제조하였다. 환원당생성량은 200 μ l의 시료와 900 μ l의 DNS 시약을 혼합하고, 10분간 99℃에서 반응시킨 후에, 상온으로 식히고 자외선/가시광선 흡광장치(UV/Vis spectrophotometer)로 546 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 검량선은 갈락토오스를 이용하여 작성하였다.

[0039] 아가레이즈의 활성 측정 실험을 위해서는, 0.25%의 아가로즈를 20mM Tris-cl 버퍼에 녹인 것을 기질 용액으로 하고 아래에서 기술할 실시예 5의 과정에서 확보한 아가레이즈 추출물을 효소액으로 사용하여 둘을 4:1의 비율로 혼합하고, 120 rpm으로 반응시켜 주었다.

[0040] <실시예 1> 신규한 아가레이즈 분비 해양 미생물의 분리

[0041] 서울 노량진 수산시장에서 구입한 소라의 내장을 처리하여 접종 시료액으로 사용하였다. 접종 배지는 4일 정도의 간격으로 4차에 걸쳐 계대 배양해 주었고, 하기 표 1과 같은 조성으로 배양 배지를 제조하였다.

표 1

[0042]

성분	1차 배지 (g/l)	2차 배지 (g/l)	3차 배지 (g/l)	4차 배지 (g/l)
NaCl	5	5	5	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	1	1	1
이스트 추출물	0.5	0.2	0	0
K ₂ HPO ₄	2	2	2	2
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.2	0.2	0.2	0.2

CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02	0.02	0.02	0.02
Agar	1	1	1	1

[0043] 질소원으로 사용된 이스트 추출물(yeast extract)에는 여러 가지 영양분이 많이 함유되어 있기 때문에, 보다 선별적으로 아가 분해균주를 선별하기 위해, 3차 배양부터는 이스트 추출물을 첨가하지 않았다.

[0044] 4차에 걸친 계대 배양 후에, NaCl 5 g/l, (NH₄)₂SO₄ 1 g/l, K₂HPO₄ 2 g/l로 희석 용액을 만들고 10⁻⁴, 10⁻⁵ 배수로 희석하여 1차 계대배양 배지와 동일한 고체배지(아가만 18 g/l)에 도말해주었다. 고체 배지 배양 결과, 콜로니 주변에 뚜렷한 침식을 보이는 미생물이 발견되었고, 이를 순수 분리하여, 루골용액으로 확인한 결과 아가레이즈를 체외로 분비하는 것을 확인할 수 있었다. 분리 미생물의 콜로니 군집 형태 및 루골 염색 결과를 도 1에 나타내었다.

[0045]

[0046] <실시예 2> 분리 미생물의 생리적생화학적 특성

[0047] 분리 미생물의 생리적, 생화학적 특성을 조사하였다. 분리 미생물의 생리적, 생화학적 특성 조사를 위해서는, bioMerieux사의 API 20NE, API ZYM 키트를 사용하였다. 이때 시료액은 멸균된 식염수와 해수용액의 두 가지 경우로 제조하였다. 분리 미생물의 생리적, 생화학적 특성은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0048]

특성	식염수	해수용액
전형적실험(API 20NE)		
질산염의 아질산염으로의 환원	+	+
질산염의 질소로의 환원	+	+
인돌 생산(트립토판)	-	-
발효(글루코스)	-	-
아르기닌 디하이드로라제	-	-
우레아제	-	-
가수분해(β-글루코시다제)(에스쿨린)	-	-
가수분해(프로테아제)(젤라틴)	-	+
β-갈락토시다제	-	-
동화실험(API 20NE)		
D-글루코스	+	+
L-아라비노스	-	-
D-만노스	-	-
D-만니톨	-	+
N-아세틸-글루코사민	-	-
D-말토스	+	+
글루콘산 칼륨	+	+
카프린산(Capric Acid)	-	-
아디프산(adipic acid)	-	-
말산(malic acid)	+	+
시트르산삼나트륨(TrisodiumCitrate)	-	+
페닐아세트산	-	-
효소활성(API zym)		
알칼린 포스파타제	+	+
에스테라제(C4)	+	+
에스테라제 리파아제(C8)	+	+
리파아제(C 14)	-	-
루이신 아릴아미다제	+	+
발린 아릴아미다제	+	+

시스틴 아를아미다제	-	-
트립신	-	-
α -키모트립신(chymotrypsin)	-	-
산 포스파타제(Acid phosphatase)	-	+
나프톨-AS-BI-포스포하이드롤라제	+	+
α -갈락토시다제	-	-
β -갈락토시다제	-	-
β -글루쿠로니다제(glucuronidase)	-	-
α -글루코시다제	-	-
β -글루코시다제	-	-
N-아세틸- β -글루코사미니다제	-	-
α -만노시다제	-	-
α -푸코시다제	-	-

[0049] 분리 미생물의 경우, 몇 가지 효소의 활성이 식염수보다 해수에서 높게 나타났고, 이는 염화나트륨이 효소의 활성에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

[0050] 또한 분리 미생물의 생장에 염화나트륨이 미치는 영향을 확인하기 위해, 1차 계대배양 배지에서 염화나트륨의 농도를 15 g/l, 25 g/l로 조절하여 배양실험을 수행하였고 그 배양곡선을 도 2에 나타내었다.

[0051] <실시예 3> 분리 미생물의 동정

[0052] 분리 미생물의 정확한 동정을 위해, 16s rRNA 동정을 시행하였다. 분리 미생물의 염색체 DNA를 추출한 후, 증합효소 증폭법(Polymerase Chain Reaction, PCR)으로 16s rRNA 단편을 증폭하였고 이의 염기서열을 결정하여 이를 서열목록 제1서열에 나타내었다. 상기 16s rRNA 염기서열을 미국 생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)의 BLASTN 프로그램을 이용하여 GenBank의 데이터베이스와 비교하였다. 그 결과 상기 16s rRNA 염기서열과 100% 동일한 염기서열을 갖는 기존의 미생물은 존재하지 않았는바 본 발명의 분리 미생물은 신종으로 판명되었다.

[0053] 상동성 비교분석은 ClastalW와 Mega 4 프로그램을 이용하여 시행하였고 작성한 계통수를 도 3에 나타내었다. 분리 미생물은 슈도알테로모나스(*Pseudoalteromonas*)속에 속하는 것으로 동정되었으며, 최종적으로 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1(*Pseudoalteromonas sp. JYBCL 1*)으로 명명하여 이를 기탁기관 한국미생물보존센터에 2010년 11월 30일자로 기탁하고 기탁번호 KCCM11139P를 부여받았다.

[0054] <실시예 4> 분리 미생물의 아가 분해능 확인

[0055] 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1의 아가 분해능을 확인하기 위해 추가적인 배양 실험을 수행하였다. 배양배지는 1차 계대배양 배지와 동일하게(아가의 양만 2 g/l) 제조하였고 균의 생장과 배지 내 점도를 측정하여 도 4에 나타내었다. 배양 후 시간이 지남에 따라, 배지 내 점도가 줄어드는 것을 육안으로도 확인할 수 있었으며, 실제 점도 측정 결과도 균이 성장함에 따라 배지 내 점도가 줄어드는 것으로 확인되었다.

[0056] <실시예 5> 당화를 위한 아가레이즈 추출물 확보

[0057] 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1의 경우, 아가레이즈를 체외로 분비하는 것이 확인되었기에, 하기 방법으로 아가레이즈 추출물을 확보하였다. 균주를 배양한 후, 12시간이 되었을 때 4℃에서 7000 g의 가속도로 30분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액을 모은 뒤 (NH₄)₂SO₄를 70% (g/ml)가 되도록 첨가하며 녹여주었다. 그 후, 4℃에서 14500 g의 가속도로 30분간 원심분리하고 상등액은 버린 뒤에 단백질을 침전물을 20 mM Tris-HCl 버퍼(pH 8)로 재부유시켜 아가레이즈 추출물을 확보하였다. 또한 필요시에는 동일한 버퍼에서 투석하여 정제하였다.

[0058] <실시예 6> 당화를 위한 아가레이즈 활성 최적화

[0059] 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1이 분비하는 아가레이즈의 활성 최적화를 위해 온도와 pH 최적화 실험을 수행하였다. 온도 최적화 실험은 15, 25, 35, 45 및 55℃의 다섯 가지 온도에서, 하룻동안 반응 시킨 후 반응액 내에 생성된 환원당의 양을 측정함으로써 수행하였다. pH 최적화 실험은 pH 4, 5, 6, 7, 8 및 9의 여섯 가지 pH에서, 하루 동안 반응시킨 후 반응액 내에 생성된 환원당의 양을 측정함으로써 수행하였으며 그 결과를 상대적 활성도로써 각각 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0060] <실시예 7> 아가레이즈의 구조적 안정도 측정

[0061] 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1이 분비하는 아가레이즈의 3차원 단백질 구조가 이온적 스트레스에 얼마나 안정적인가를 측정하기 위한 실험을 문헌(Hiroshi Xavier Chiura et al., Purification and Characterisation of a Novel Agarase Secreted by a Marine Bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. Strain CKT1, *Microbes and Environments* 15(1):11-22(2000))에 기재된 방법에 따라 수행하였다.

[0062] 아가로즈 기질 용액에 염화나트륨을 농도별로 첨가하여, 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1이 분비하는 아가레이즈의 NaCl 농도가 증가함에 따른 상대적 활성도의 감소를 측정하여 도 7에 나타내었다. 또한, 문헌(Hiroshi Xavier Chiura et al., Purification and Characterisation of a Novel Agarase Secreted by a Marine Bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. Strain CKT1, *Microbes and Environments* 15(1):11-22(2000))에 기재된 종래 아가레이즈의 NaCl 농도가 증가함에 따른 상대적 활성도의 감소는 도 8에 나타내었다.

[0063] 도 7 및 8을 비교해보면, 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1이 분비하는 아가레이즈가 기존에 알려진 다른 아가레이즈보다 현저하게 우수한 이온 안정성을 가짐을 확인할 수 있다.

[0064] <실시예 8> 아가레이즈의 확인

[0065] 채외분비 단백질 중 아가레이즈의 존재 여부를 확인하기 위해 지모그램(zymogram) 분석을 실시하였다. 실시예 5에서 확보한 아가레이즈 추출물로 에스디에스페이지 전기영동을 시행하였고, 따로 제작한 아가 겔에 전기영동 겔을 덮어 반응시킨 후 루골용액으로 염색하여 아가레이즈 밴드를 확인하여 도 9에 나타내었다.

[0066] <실시예 9> 아가레이즈를 이용한 우뭇가사리의 직접 당화

[0067] 확보한 아가레이즈 추출물로 우뭇가사리를 직접 당화하기 위한 실험을 실시하였다. 아가, 우뭇가사리 마쇄가루를 각 0.25%(w/v)로 함유하는 완충용액에 아가레이즈 추출물을 첨가하여 두 가지 기질의 환원당 생성농도와 아가를 기질로 사용하였을 경우에 생성된 환원당의 양을 100%로 하였을 때의 두 기질의 상대적 활성도를 아래의 표 3에 나타내었다.

표 3

기질	환원당 생성량(mM)	상대적 활성도(%)
아가	0.875	100
우뭇가사리	0.408	46.6

[0069] 실험결과 슈도알테로모나스 제이와이비씨엘 1이 분비하는 아가레이즈는 기존에 알려진 다른 아가레이즈와는 달리 우뭇가사리로부터 아가로즈나 아가를 생산하는 전처리 과정없이 우뭇가사리를 직접 그 기질로 활용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0070] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0071]

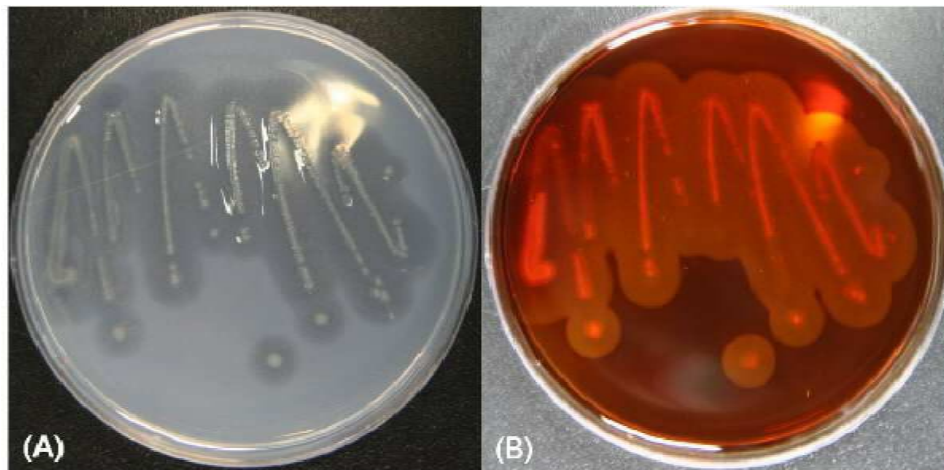
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11139

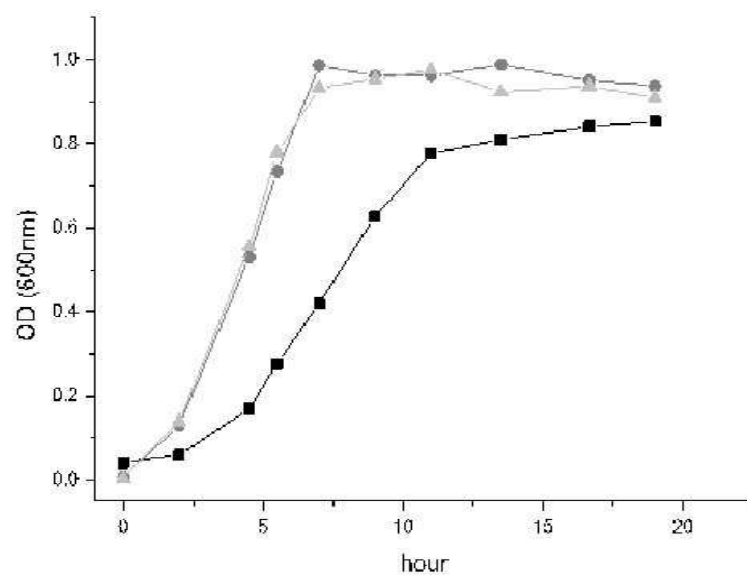
수탁일자 : 20101130

도면

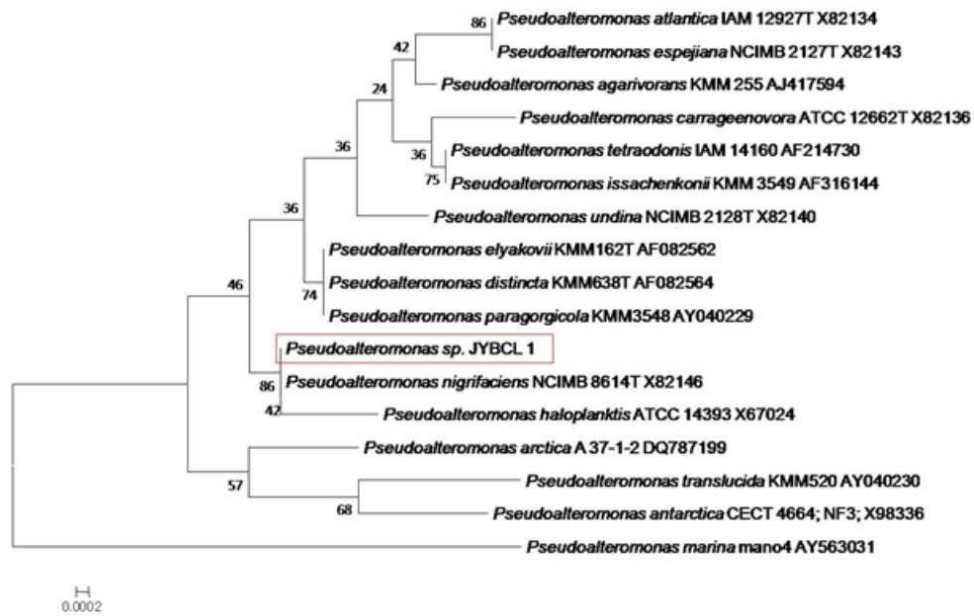
도면1



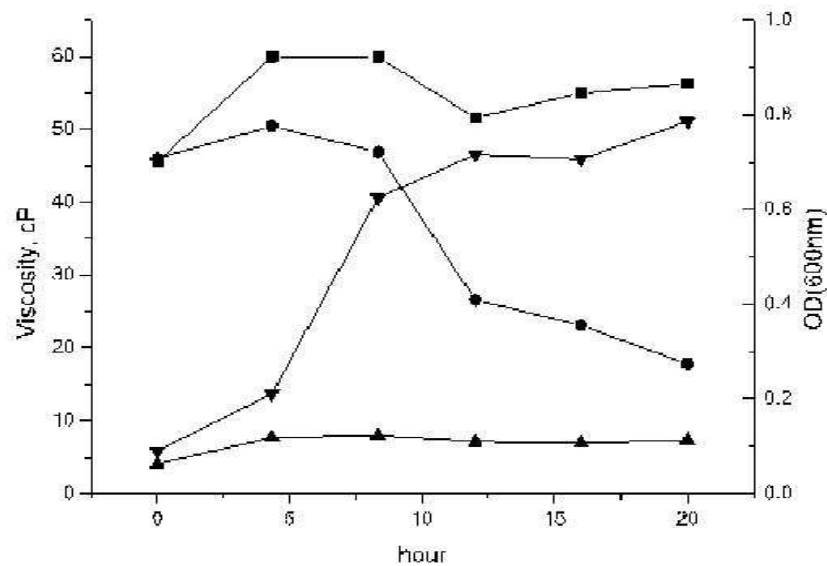
도면2



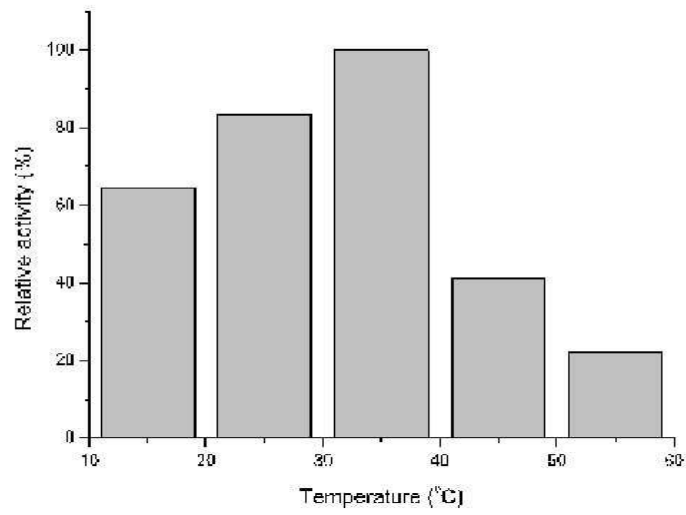
도면3



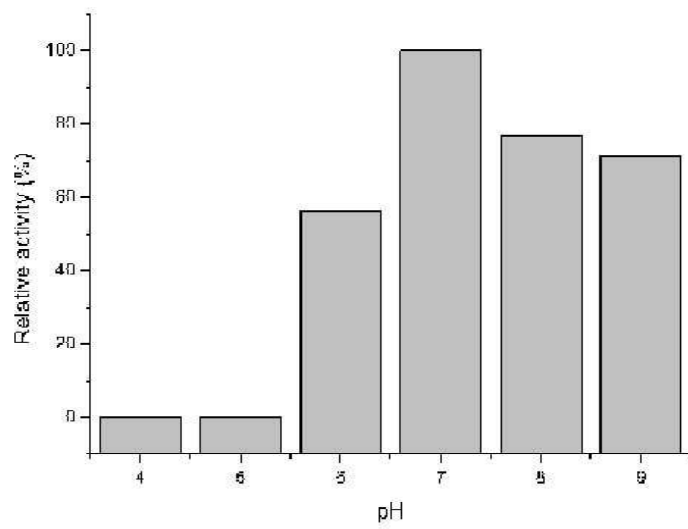
도면4



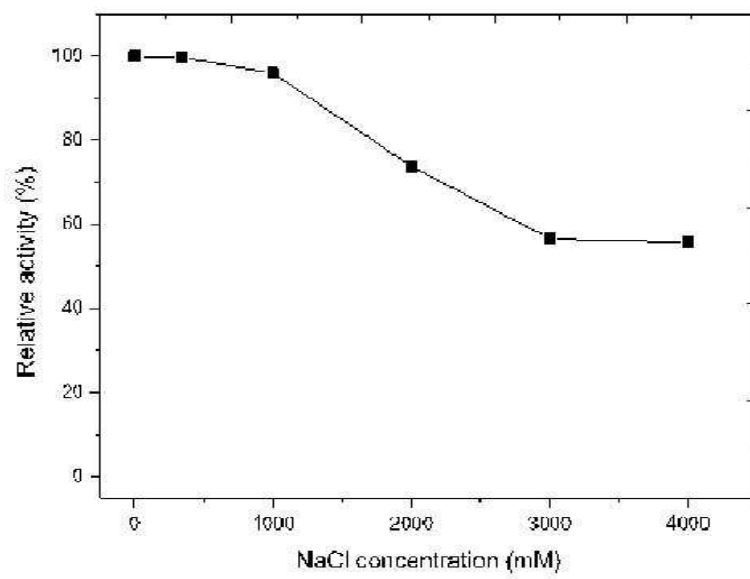
도면5



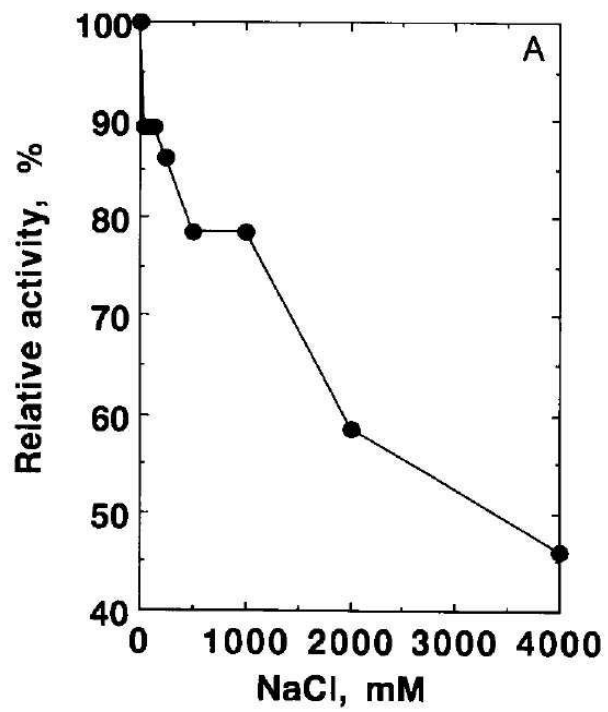
도면6



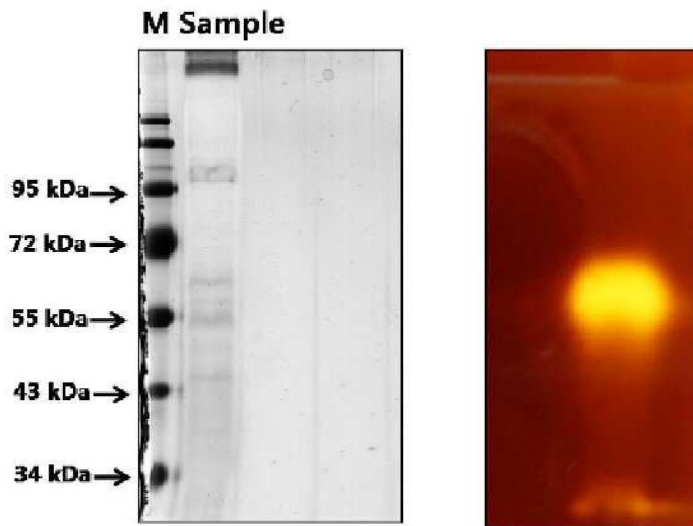
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Yonsei University
 <120> Novel Pseudoalteromonas sp. and Agarase Produced by the Same
 <160> 1
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 947
 <212> DNA
 <213> Pseudoalteromonas sp. JYBCL 1, 16s rRNA
 <400> 1

```

ggtacgtcct cccgagggtt agactatcta cttctggagc aaccactcc catggtgtga      60
cgggcgggtgt gtacaaggcc cgggaacgta ttcaccgcgt cattctgata cgcgattact    120
agcgattccg acttcatgga gtcgagttgc agactccaat ccggactacg acgcacttta    180

agtgattcgc ttaccttcgc aggttcgcag cactctgtat gcgccattgt agcacgtgtg     240
tagccetaca cgtaagggcc atgatgactt gacgtcgtec ccaccttcct cgggtttatc     300
accggcagtc tccttagagt tctcagcatt acctgctagc aactaaggat aggggttgcg     360
ctcgttgcgg gacttaacct aacatctcac aacacgagct gacgacagcc atgcagcacc     420
tgtatcagag ttcccgaagg cacaaacca tctctggtaa gttctctgta tgtcaagtgt     480
aggtaaggtt cttcgcgttg catcgaatta aaccacatgc tccaccgctt gtgcgggccc     540
ccgtcaattc atttagattt taaccttgcg gccgtactcc ccaggcggtc tacttaatgc     600

glttagctttg aaaaacagaa ccgaggctcc gagcttctag tagacatcgt ttacggcgtg     660
    
```

gactaccggg gtatctaatac ccgtttgctc cccacgttt cgtacatgag cgtcagtgtt	720
gaccaggtg gctgccttcg ccatcggtat tccttcagat ctctacgcat ttcaccgcta	780
cacctgaaat tctaccaccc tctatcacac tctagtttgc cagttcgaaa tgcagttccc	840
aggttgagcc cggggctttc acatctcgct taacaaaccg cctgcgtacg ctttacgccc	900
agtaatttcc gattaacgct cgcacctcc gtattaccgc ggctgct	947